

Title	シロイヌナズナの側根形成初期にオーキシンの生合成と能動輸送は関与するのか？
Author(s)	
Citation	令和2（2020）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書
Issue Date	2021-04
oaire:version	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/80637">https://hdl.handle.net/11094/80637</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 令和2年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏名	かねた さなえ 金田 紗苗	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	柿本 辰男	所属	理学研究科生物科学専攻		
研究課題名	シロイヌナズナの側根形成初期にオーキシンの生合成と能動輸送は関与するの？				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

## 研究目的

シロイヌナズナの主根の内鞘細胞から新たな側根原基が形成される過程は、もともと等価な細胞が並ぶ内鞘組織から自律的にパターンが生じる自己組織化のひとつである。側根形成の際には内鞘細胞の側根形成位置で側根原基形成に先立って植物ホルモンのオーキシンに対する応答が局所的に強まることが必要であることが知られており、これには細胞膜上でオーキシン輸送体 PIN が局在化することによってオーキシンが必要な位置に集まる極性輸送が非常に重要であることが報告されている<sup>1)</sup> (Fig. 1a)。一方、オーキシンの局所的な生合成も内鞘細胞分裂パターンに関与するか否かは調べられていない。

また、このような側根原基の自己組織化は、シロイヌナズナの根に外からオーキシンを与えた際にも起こり、根に外からオーキシンを与えて1日後には内鞘細胞でオーキシンに応答した細胞分裂が盛んに誘導されて側根原基様の構造を生じる位置と、細胞分裂が起こりにくくなる位置とが交互に生じるパターンが形成され、通常より高密度で側根原基を生じる (Fig. 1b)。先行研究では、オーキシンを外から与えた際に生じる内鞘細胞の分裂パターンにもオーキシンの極性輸送が必要であることが示されている<sup>1)</sup>。

本研究では、このような側根原基の自己組織化には、オーキシン能動輸送のみでなく局所的なオーキシン生合成も関与するのではないかという仮説を立て、外からオーキシンを与えた際に誘導される側根原基形成初期におこる内鞘細胞の分裂パターンに着目して、側根原基の自己組織化におけるオーキシン生合成の役割を明らかにすることを目的に実験を行った。

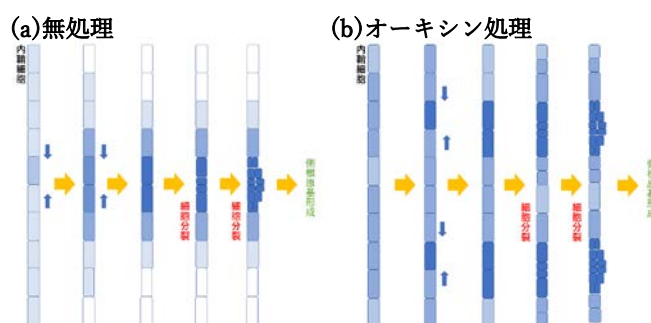


Fig. 1. 内鞘細胞の分裂パターン形成

a は無処理の場合、b はオーキシンを外から与えた場合に内鞘細胞で分裂が誘導される様子。

図の四角形は内鞘細胞、矢印は側根原基周辺でオーキシンの輸送される方向を示す。細胞の色は細胞内に存在するオーキシン濃度を表し、色が濃いほどオーキシンが高濃度で存在することを示す。オーキシン処理下において b のようにオーキシン濃度勾配が形成されるか否かは報告されていないため、ここではオーキシン輸送体 PIN の分布から予想した仮想的なオーキシンの分布を示した。

## 研究方法

## 方法 1

シロイヌナズナの根に外からオーキシンを与えることによって誘導される側根形成では、側根形成の初期に内鞘細胞でオーキシンに応答して盛んに分裂する位置とそうでない位置を交互に生じるようなパターンをもって細胞分裂が促進される。この実験では、オーキシンを外から与えた際の側根形成初期に内鞘細胞で起こるオーキシンに応答した細胞分裂パターンの形成に、オーキシン生合成阻害剤が影響を与える否かを調べることを目的に実験を行った。

実験ではオーキシン応答レポーター遺伝子 *DR5::N7 venus* を導入したシロイヌナズナの形質転換体を通常の発芽用培地で種から 7 日間培養したのち、天然オーキシン IAA 2  $\mu$ M のみ、または、IAA 2  $\mu$ M と IAA 生合成阻害剤 4-フェノキシフェニルボロン酸 (4-phenoxyphenylboronic acid, PPBo) 10  $\mu$ M、のいずれかを含む培地で 1 日間培養し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

また、根の先端にある静止中心特異的に蛍光が見られるマーカー系統を利用し、同様の条件で 4 日間処理した場合に形成される側根原基の形態がオーキシン生合成阻害剤によってどのような影響を受けるか、観察した。

## 方法 2

実験 1 では、IAA 生合成阻害剤 PPBo によって側根形成初期の内鞘細胞の分裂パターンに異常が生じ、内鞘細胞で全体的に分裂が誘導される結果が得られた（「結果・考察」参照）。しかし、オーキシン生合成阻害剤ではオーキシン生合成の阻害のみでない副作用が内鞘細胞の分裂パターン形成に対して阻害的にはたらいっていた可能性を否定できない。そこで実験 2 では、実験 1 の結果を受け、オーキシン生合成に関わる遺伝子の変異によってオーキシン生合成が阻害された場合にも、オーキシン生合成阻害剤を用いた実験 1 の結果と同様に内鞘細胞の分裂が全体的に促進されるのか、ということを明らかにすることを目的に実験を行った。

この実験では、オーキシン生合成酵素の YUCCA ファミリーのうち、根で発現量の多いサブファミリー (YUC3, YUC5, YUC7, YUC8, YUC9) を欠損したシロイヌナズナの五重変異体 *yucQ*<sup>2)</sup>を用いた。この *yucQ* と野生型 *columbia* を種から 1 週間通常の発芽用培地で培養したのちに IAA 2 $\mu$ M を含む培地に移し、1 日培養した時点で染色した細胞の核の分布を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、同様にして種から 1 週間通常の発芽用培地で培養したのちに IAA 2 $\mu$ M を含む培地に移し 2 日間培養した個体の根の形態も、実体顕微鏡を用いて観察した。

## 結果・考察

**オーキシン合成阻害剤は内鞘細胞の全体的な分裂を引き起こし、融合した側根原基を形成する**

IAA のみで処理した場合には、IAA によって内鞘細胞で分裂が盛んに誘導された結果オーキシンに比較的強く応答した細胞が密に並んだ部分と、内鞘細胞で分裂があまり誘導されずオーキシンに応答した細胞の密度が低い部分とが交互に生じるパターンをもって細胞分裂が誘導されていた (Fig. 3a)。一方、IAA に加えて IAA 生合成阻害剤 PPBo を与えた場合には、オーキシンに比較的強く応答した細胞が、より全体的に分布して見られるようになった (Fig. 3b)。このように、「PPBo が高濃度になるほど、オーキシンに比較的強く応答した細胞が密に分布する領域が広がって全体的に見られるようになった」という結果から、オーキシン生合成が側根形成初期に内鞘細胞で起こる、オーキシンに応答した細胞分裂パターンの形成に関与すること、特に、側根原基形成位置以外で内鞘細胞のオーキシンに応答した分裂を抑制する過程に関与していることが示唆された。

また、IAA 処理 1 日時点では前述のように PPBo によって内鞘細胞の分裂パターンの形成が阻害されたが、これを同様の条件でさらに長時間培養すると、PPBo 存在下であっても側根原基様の構造が

形成された。しかし、IAA 2 $\mu$ M のみを含む GM で 4 日間培養した場合には正常な形態の側根が形成された (Fig. 4a) のに対し、IAA 2 $\mu$ M と PPBo 10 $\mu$ M を含む GM で 4 日間培養した場合には側根原基が短いままであり、また、IAA のみで処理した場合には見られない、複数の側根原基が融合したような構造が見られた (Fig. 4b)。このことから、オーキシン生合成は、側根原基形成位置の周辺で別の側根原基が形成されないようにする側方抑制に関与していることが示唆された。

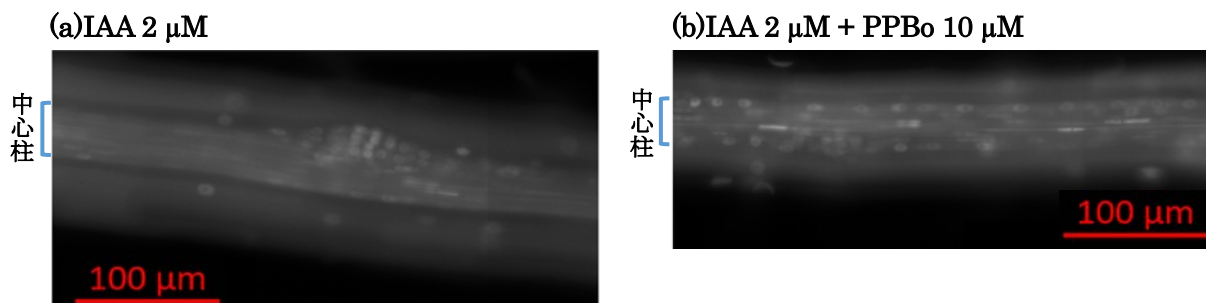


Fig. 3. 内鞘細胞の分裂に対する PPBo の影響

IAA のみまたは IAA と PPBo を含む GM で 1 日間培養した *DR5::N7 venus* の主根で、根端から約 2mm-3mm の領域を撮影した蛍光顕微鏡写真の一部。図の左側が根端側。

白く見られる部分はオーキシンの応答した細胞の核。内鞘細胞は中心柱の一番外側の層で、楕円形の核を有する。内鞘細胞より内側にある細長い像は維管束の核。

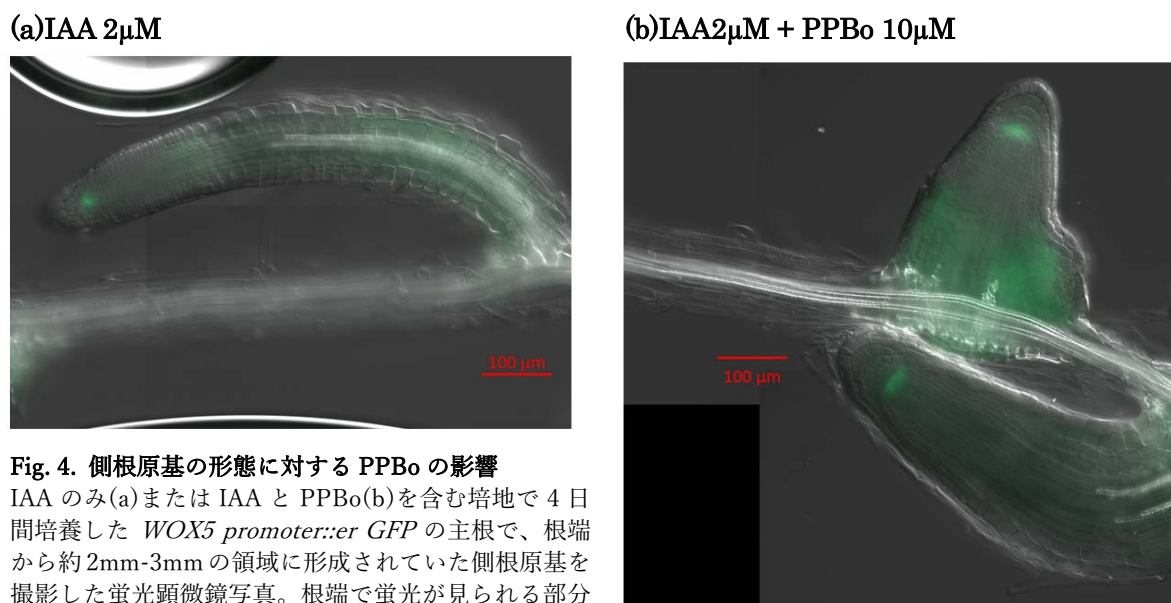


Fig. 4. 側根原基の形態に対する PPBo の影響

IAA のみ(a)または IAA と PPBo(b)を含む培地で 4 日間培養した *WOX5 promoter::er GFP* の主根で、根端から約 2mm-3mm の領域に形成されていた側根原基を撮影した蛍光顕微鏡写真。根端で蛍光が見られる部分が静止中心。

### オーキシン合成変異体は内鞘細胞増殖領域の局在を曖昧にし、多数の側根原基を形成する

野生型のシロイヌナズナに IAA 2 $\mu$ M を 1 日処理した場合には、内鞘細胞の核が密に分布して側根原基様の構造を形成した部分と、細胞分裂があまり促進されず核の密度が疎である部分とが交互に生じるパターンが見られた (Fig. 5c)。一方、*yucQ* 変異体に IAA 2 $\mu$ M を処理すると、野生型と比較して内鞘細胞の核の密度が高い領域がより高頻度で生じ、また、細胞密度の高い領域とそうでない領域との間の細胞密度の差が減少した (Fig. 5d)。また、IAA 処理 2 日後には野生型と比較して *yucQ* で側根原基が高密度で形成された (Fig. 6)。

実験 2 では、*YUCCA* 遺伝子の変異によって、側根形成初期の内鞘細胞の分裂が全体的に起こる結果が得られた。この結果は実験 1 で *YUCCA* 酵素を阻害した場合に内鞘細胞で分裂の促進される領域が広がって全体的にみられるようになったこととも一致する。このことから、実験 1 において示唆さ

れた、局所的なオーキシン生合成が側根原基の形成されない位置で内鞘細胞のオーキシンに応答した分裂を抑制する過程に関与する可能性が支持された。

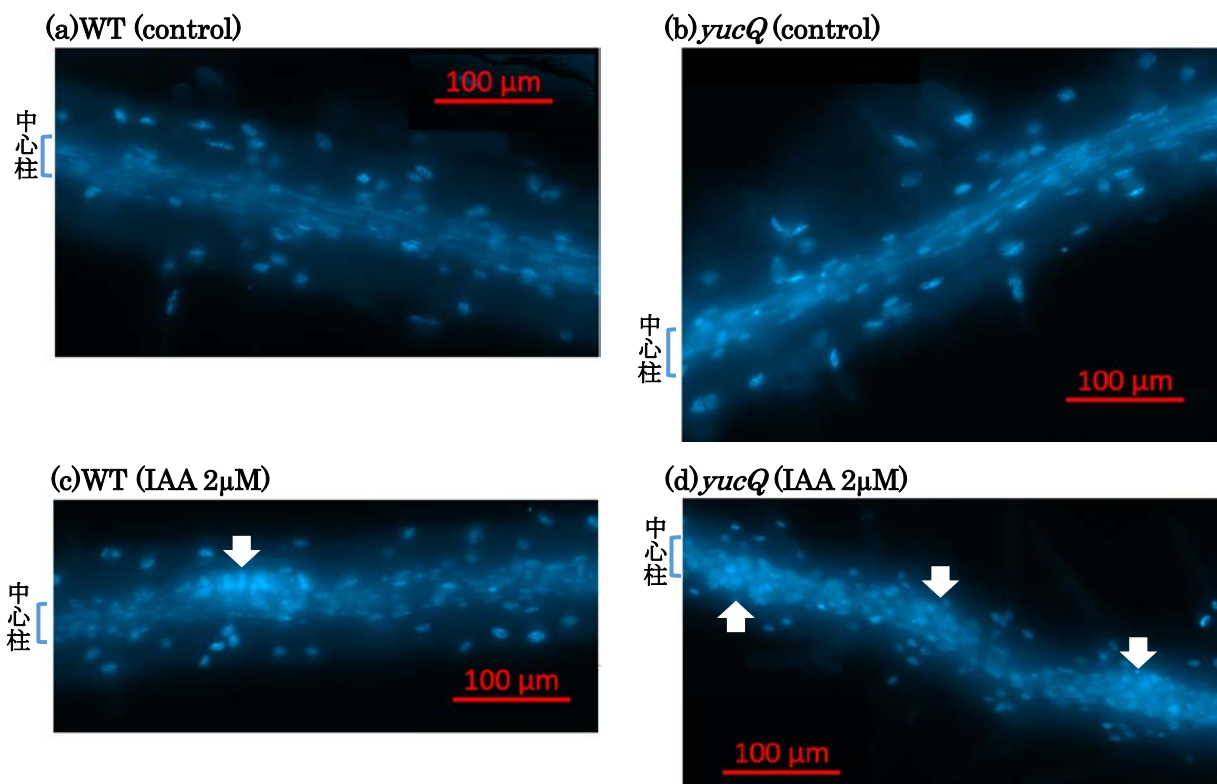


Fig. 5. オーキシン生合成変異体における内鞘細胞の分裂 (2020 年 10 月 14 日撮影)

シロイヌナズナの野生型 (WT) と *yucQ* を有機溶媒 DMSO のみ (control) または、IAA 2μM で 1 日処理したのちに DAPI によって核を染色した際の蛍光顕微鏡写真 (ZEN 3.0 を用いて Maximum Projection を行った)。蛍光を発して見られる部分は細胞の核。矢印は、内鞘細胞で盛んに分裂が促進されて核が密に並んだ部分を示す。

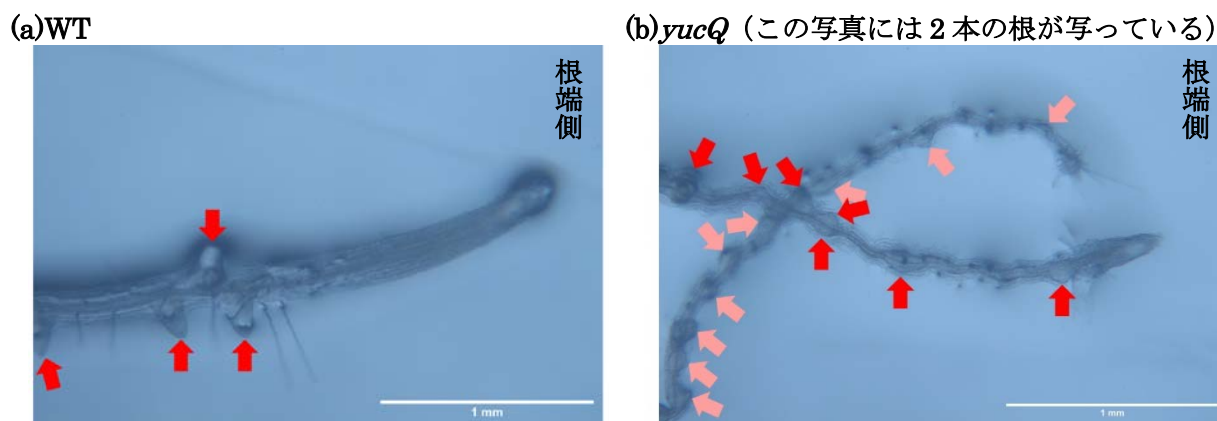


Fig. 6. オーキシン生合成変異体における IAA 処理時の側根原基 (2020 年 10 月 7 日撮影)

シロイヌナズナの野生型 (WT) と *yucQ* を IAA 2μM で 2 日間処理した根の根端から 2mm ほどまでの全体像を実体顕微鏡で観察した写真。矢印は、側根原基の形成された位置を示す。*yucQ* の写真では長い根が 2 本重なっていたため、根ごとに別の色の矢印で示した。(Scale Bar=1mm)

## 研究成果

オーキシンは内鞘細胞の分裂を促進し側根形成に必須な植物ホルモンとして知られている。本研究では、オーキシンを外から与えた条件下では、オーキシン生合成酵素 YUCCA の阻害剤や YUCCA 遺伝子の変異によって、オーキシン生合成が阻害されているにもかかわらず、側根形成初期の内鞘細胞において分裂が誘導される領域が増加することを見出した。また、オーキシンで長期間処理した際に起こる側根原基形成においては、YUCCA の阻害剤によって側根原基が融合したような構造を生じた



り、*YUCCA* 遺伝子の変異によって側根原基が高密度で生じたりすることを見出した。これらの異常は、オーキシン生合成酵素である *YUCCA* の阻害によって、内鞘細胞で本来分裂が抑制されるはずの位置で細胞分裂が抑制されにくくなった結果であると解釈でき、このことから、オーキシン生合成酵素である *YUCCA* が側根原基自己組織化の初期に側根原基の形成されない位置で内鞘細胞の分裂を抑制する側方抑制に関与していることが示唆された。本研究によって、全体的なオーキシン濃度が充分である場合にオーキシン生合成が側根原基の自己組織化に寄与することが示唆されたが、この可能性の一つとして局所的なオーキシン生合成が側根形成に先立って内鞘細胞で誘導されていることが考えられる。

側根形成初期の細胞の細胞膜上では、オーキシン濃度の高い位置である側根原基の中心に近い側に、オーキシン輸送体

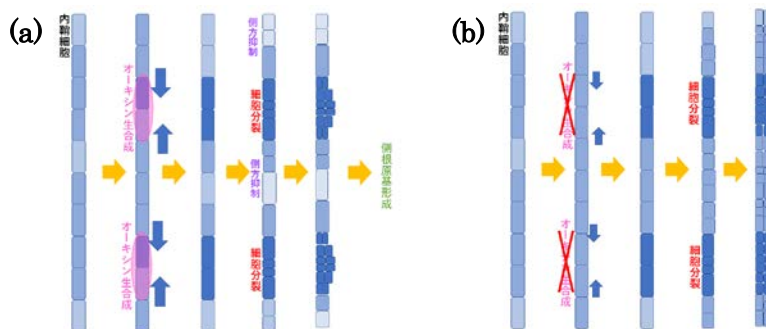


Fig. 7. 局所的オーキシン生合成が側根原基の自己組織化に関与するモデル

(a) 今回の実験から立てた、局所的なオーキシン生合成が側根形成初期の内鞘細胞の分裂パターン決定に関与するモデル。側根形成位置で局所的なオーキシン生合成が起こることによってオーキシンの極性輸送が促進されて側根形成位置にオーキシンが集まりやすくなり、これによってオーキシン濃度が低下した位置で側方抑制が誘導されているのではないかと考えた。

(b) a のモデルに従って考えた、オーキシン生合成阻害が内鞘細胞分裂パターンに与える影響。オーキシン生合成が阻害されることで側根原基が形成されない位置でオーキシン濃度が十分に低下せず、側方抑制が阻害されて内鞘細胞が全体的に分裂したと考えられる。

PIN が局在化することが報告されている<sup>1)</sup>ほか、植物の地上部ではオーキシン濃度の高い方向にオーキシンが輸送される正のフィードバックがあればオーキシン濃度のパターンは自律的に生じることが数理モデルによって示されている<sup>3)</sup>。私は、今回の実験結果から、オーキシンの局所的な生合成が側根形成位置で起こることによって側根形成位置とそうでない位置との間でオーキシン濃度の差が強まり、このことによってオーキシン濃度の高い位置にオーキシンが局在化しやすくなっているのではないかという仮説を立てた。これに従って考えると、今回の実験でオーキシン生合成の阻害によって内鞘細胞の分裂が本来は抑制される筈の位置で抑制されにくくなった、という結果から、オーキシン極性輸送によって側根の形成されない位置でオーキシン濃度が積極的に低下することが側根形成位置以外で内鞘細胞の分裂が抑制されるうえで重要で、オーキシンの生合成は、このようなオーキシン極性輸送を促進する因子として作用している可能性が考えられる (Fig. 7)。

以上のように、今回の実験では局所的なオーキシン生合成が側根原基自己組織化のうち細胞分裂の側方抑制に関与している可能性が提示された。今後は、*YUCCA* がシロイヌナズナの根で局所的に発現しているか否かを調べたいと考えている。

#### 参考文献

1. Bencová *et al.* (2003) Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* **115**:591-602
2. Chen *et al.* (2014) Auxin Overproduction in Shoots Cannot Rescue Auxin Deficiencies in Arabidopsis Roots. *Plant Cell Physiol* **55**(6):1072-1079
3. Jönsson *et al.* (2006) An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **31**:1633-1638.